

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出版

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年12 月31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/001031 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 9/44, 9/16, (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).  
C12P 19/04, C08B 37/00 // C12N 15/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007838
- (22) 国際出願日: 2003 年6 月20 日 (20.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-180490 2002 年6 月20 日 (20.06.2002) JP  
特願2002-239843 2002 年8 月20 日 (20.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 酒井 武 (SAKAI, Takeshi) [JP/JP]; 〒525-0072 滋賀県 草津市 笠山 4 丁目 9-1 1 Shiga (JP). 石塚 久美子 (ISHIZUKA, Kumiko) [JP/JP]; 〒036-8171 青森県 弘前市 取上 4 丁目 8-6 0 Aomori (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府 宇治市 南陵町 1-1-1 5 0 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ENZYME FOR DECOMPOSITION OF SULFATED FUCAN DERIVED FROM SEA CUCUMBER

(54) 発明の名称: ナマコ由来硫酸化フカン分解酵素

(57) Abstract: Sulfated fucan lyase capable of decomposing sulfated fucan derived from sea cucumber; a process for producing the enzyme; a low molecular compound obtained by causing the enzyme to act on sulfated fucan; a process for producing the same; and an activating factor for sulfated fucan lyase.

(57) 要約: ナマコ由来硫酸化フカンを分解する硫酸化フカン分解酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フカンに該酵素を作用させて得られる低分子化合物及びその製造方法、ならびに硫酸化フカン分解酵素の活性化因子。

WO 2004/001031 A1

## 明 細 書

## ナマコ由来硫酸化フカン分解酵素

## 5 技術分野

本発明は糖鎖工学分野において有用な硫酸化フカンを分解する酵素、該酵素の製造方法、該酵素を活性化させる様々な因子、並びに糖鎖工学用試薬として有用な硫酸化フカンオリゴ糖、及びそれらの製造方法に関する。

## 10 背景技術

ナマコには数種の硫酸化多糖が含まれている。これらの中には、硫酸化フコースを主要構成成分とする多糖、すなわち、硫酸化フカンが存在する。ナマコ由来硫酸化フカンのエイズウイルス感染抑制作用や抗凝血作用等が報告されているが、ナマコ由来硫酸化フカン医薬品として開発する場合、その構造を決定する必要が生じる。ナマコ由来硫酸化フカンの構造は研究されているが、現時点ではその平均的構造が判明しているに過ぎない。硫酸化フカンの構造決定の際、硫酸化フカン分解する酵素を用いれば非常に有利であるが、ナマコ由来硫酸化フカン分解する酵素は市販されていない。一方、硫酸化フカンは種々の褐藻類にも含まれており、その構造は由来となる海藻により異なることが多い。例えば、ヒバマタ、マコンブ、モズクそれぞれから抽出される硫酸化フカンは異なる構造を持つ。そして、これまで褐藻類由来の硫酸化フカン分解する酵素がいくつか報告されているが（国際公開第96/34004号パンフレット、国際公開第97/26896号パンフレット、国際公開第99/11797号パンフレット、国際公開第99/41288号パンフレット、欧州特許出願公開第1306389号明細書）、いずれも、ナマコ由来硫酸化フカン分解することはできない。すなわち、ナマコ由来硫酸化フカンと褐藻類由来硫酸化フカンの構造は異なると考えられる。

以上のことから、ナマコ由来硫酸化フカン分解する酵素、及び酵素的に製造した構造が均一な硫酸化フカンオリゴ糖が求められていた。

## 発明の目的

すなわち、本発明の目的は、ナマコ由来硫酸化フカンを分解する硫酸化フカン分解酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フカンに該酵素を作用させて得られる低分子化物及びその製造方法を提供することにある。また、本発明の目的は、硫酸化フカン分解酵素の活性化因子を提供することにもある。

## 発明の概要

本発明者らは、フコイダノバクター属に属する細菌の1菌株、フコイダノバクター マリナス (*Fucoidanobacter marinus*) SI-0098が新規な硫酸化フカン分解酵素を生産することを見出し、該酵素の製造方法を見出した。また、該酵素を利用してナマコ由来硫酸化フカンから、新規な硫酸化フカンオリゴ糖を製造できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明の第1の発明は、フコイダノバクター属細菌の培養物から得られたエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼに関する。

本発明の第1の発明において、該酵素は、エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ生産能を有するフコイダノバクター属細菌を培養し、その培養物から採取することができる。

本発明の第2の発明は、フコイダノバクター属細菌の培養物から得られた硫酸化フカンスルファターゼに関する。

本発明の第2の発明において、該酵素は硫酸化フカンスルファターゼ生産能を有するフコイダノバクター属細菌を培養し、その培養物から採取することができる。

本発明の第3の発明は、ナマコ由来硫酸化フカン画分に、本発明の第1の発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖に関する。

本発明の第3の発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、ナマコ由来硫酸化フカン画分に本発明の第1の発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法によって製造することができ、塩化ナトリウムの共存下で行っても良い。

本発明の第4の発明は、ナマコ由来硫酸化フカン画分に、本発明の第1の発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び本発明の第2の発明の硫酸化フカンスルファターゼを作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖に関する。

本発明の第4の発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、ナマコ由来硫酸化フカン画分に本発明の第1の発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び本発明の第2の発明の硫酸化フカンスルファターゼを作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法によって製造することができ、塩化ナトリウム及び／又は塩化カルシウムの共存下で行っても良い。

#### 10 図面の簡単な説明

図1 本発明により得られるエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼのpHと相対活性(%)の関係を表すグラフである。

図2 本発明により得られるエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの温度(°C)と相対活性(%)の関係を表すグラフである。

15 図3 本発明により得られるエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの塩濃度(mM)と相対活性(%)の関係を表すグラフである。

図4 本発明により得られる硫酸化フカンスルファターゼのpHと相対活性(%)の関係を表すグラフである。

図5 本発明により得られる硫酸化フカンスルファターゼの温度(°C)と相対活性(%)の関係を表すグラフである。

20 図6 本発明により得られる硫酸化フカンスルファターゼの塩濃度(mM)と相対活性(%)の関係を表すグラフである。

図7 本発明により得られるエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼにより硫酸化フカンを分解して得られる硫酸化フカンオリゴ糖をゲルろ過した際の溶出パターンを表す図である。

25 図8 本発明により得られるエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼと硫酸化フカンスルファターゼにより硫酸化フカンを分解して得られる硫酸化フカンオリゴ糖のHPLC分析の結果を示す図である。

## 発明の詳細な説明

以下本発明に関して具体的に説明する。

本発明において、ナマコ由来硫酸化フカンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、マナマコ (*Apostichopus japonicus*) 由来硫酸化フカンを使用  
5 できる。マナマコは、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖の生産効率が高く、原料として好適である。

本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼとは、ナマコ由来硫酸化フカンに作用して還元性末端にフコースを持つオリゴ糖を生成させる酵素である。

本発明の硫酸化フカンスルファターゼとは、ナマコ由来硫酸化フカン及びナマ  
10 コ由来硫酸化フカンに本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させて生成されるオリゴ糖に作用して硫酸を遊離させる酵素である。

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、ナマコ由来硫酸化フカンに本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ単独、又は本発明の硫酸化フカンスルファターゼと一緒に作用させて得られるオリゴ糖で、還元性末端糖がフコースである。

本発明で使用するナマコ由来硫酸化フカンを製造する際にはまず、ナマコを水性溶媒中に浸し、硫酸化多糖画分を抽出する。その際硫酸化フカンの低分子化を防ぐためには、pHは4～9、温度は100℃以下が好ましい。また、上記硫酸化多糖画分中のアミノ酸や低分子性の色素等は限外ろ過等により効率良く除去できる。疎水性物質の除去には活性炭処理等も有効である。

このようにしてナマコの硫酸化多糖画分を得ることができる。該画分を硫酸化フカン画分として、例えば本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼや硫酸化フカンスルファターゼの活性測定用基質及び本発明の硫酸化フカンオリゴ糖製造用の基質として使用できる。該画分を陰イオン交換カラムで分離すればより純度の高い硫酸化フカンを得られる。上記の硫酸化多糖画分も陰イオン交換カラムで精製  
20 した硫酸化フカンとともに本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼや硫酸化フカンスルファターゼの活性測定用基質及び本発明の硫酸化フカンオリゴ糖製造用の基質として使用できる。

本発明の、エンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼの製造に使用される細菌としては、該酵素を生産する細菌であれば特に限定はない

が例えば、フコイダノバクター マリナス (*Fucoidanobacter marinus*) SI-0098株が挙げられる。当該細菌株は本発明者らが単離した細菌である。なお、上記菌株は*Fucoidanobacter marinus* SI-0098と表示され、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-14873として平成7年3月29日(原寄託日)より寄託され、ブダペスト条約に基づき上記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM BP-5403として平成8年2月15日(移管日)より寄託されている。

本発明者らは、本菌株の16S rRNAをコードするDNAの塩基配列を決定し、既知の細菌との相同性を調べ、本菌株がVerrucomicrobiaに最も近い新属の細菌であると確認した。

本菌株の16S rRNAをコードするDNAの配列を配列表の配列番号1に記載する。従って、16S rRNAをコードするDNAの配列より、フコイダノバクター マリナス SI-0098と同属と判断される細菌から得られたエンド型 $\alpha$ -ラーフコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼも、本発明のエンド型 $\alpha$ -ラーフコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼに含まれる。

本発明のエンド型 $\alpha$ -ラーフコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを生産する細菌を培養するにあたり、培地に加える栄養源は使用する微生物が利用し、該酵素を生産するものであればよく、炭素源としては、例えば、硫酸化フカン、ナマコ、干しナマコ、海藻、アルギン酸、ラミナラン、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫酸アンモニウム、尿素、尿酸等が適当である。その他にナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛等の塩化物、リン酸塩、硫酸塩等を加えてもよい。なお、一般に海水から採取した微生物は、海水あるいは市販の人工海水を用いれば極めて生育しやすい。

また、培養条件は使用する微生物、培地組成等に応じ、本発明のエンド型 $\alpha$ -ラーフコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼの生産量が最大になるように設定するが、一般に培養温度は15~30℃、培地のpHは5~9がよく、5~

7 2 時間の通気攪拌培養で本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼの生産量は最高に達する。培養終了後、遠心分離により菌体と培養上清に分画し、それぞれから本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを得ることができる。

5 上記のフコイダノバクター マリナス S I-0 0 9 8 を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常の細胞破碎手段、例えば超音波処理で菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。次いでこの抽出液から通常の精製手段により本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを精製することもできる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水カラムクロマト、ゲルろ過等により精製した本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを得ることができる。また、上述の培養上清中にも本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼが存在するので、菌体内酵素と同様の手段で精製できる。

本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼの理化学的性質は以下の通りである。

15 (I) 作用：ナマコ由来硫酸化フカンに作用して、 $\alpha$ -L-フコシル結合を加水分解する。

(I I) 至適 p H：本酵素の至適 p H は 7 ~ 9 付近にある (図 1)。

すなわち図 1 は本酵素の反応時の p H と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は p H を示す。

20 (I I I) 至適温度：本酵素の至適温度は約 2 5 ~ 4 5 °C 付近にある (図 2)。

すなわち、図 2 は本酵素の反応時の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は温度 (°C) を示す。

本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼは、硫酸化フカン分解活性を測定して確認でき、生産菌の培養液を遠心分離した上清、無細胞抽出液、各種カラムクロマトによる精製後の酵素液でも確認できる。

25 本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼは塩化ナトリウムの存在下で活性化される。

塩化ナトリウムは、試薬の塩化ナトリウム、食塩、海水、人工海水等、塩化ナトリウムを含むものならばいかなる物質でも使用できる。本発明の、エンド型  $\alpha$

—L—フコシダーゼの反応液に添加する塩化ナトリウム濃度は1 mMから1 M程度がよく、好ましくは5 mMから900 mM程度がよい。

本発明の硫酸化フカンスルファターゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：ナマコ由来硫酸化フカンに作用して、硫酸を遊離させる。また、本発明のエンド型 $\alpha$ —L—フコシダーゼと共存して、ナマコ由来硫酸化フカンの低分子化を、本発明のエンド型 $\alpha$ —L—フコシダーゼを単独で作用させた場合よりも進行させる。

(I I) 至適pH：本酵素の至適pHは6～8付近にある(図4)。

すなわち図4は本酵素の反応時のpHと相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性(%)、横軸はpHを示す。

(I I I) 至適温度：本酵素の至適温度は約20～45℃付近にある(図5)。

すなわち、図5は本酵素の反応時の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性(%)、横軸は温度(℃)を示す。

本発明の硫酸化フカンスルファターゼは、遊離した硫酸を測定して確認でき、生産菌の培養液を遠心分離した上清、無細胞抽出液、各種カラムクロマトによる精製後の酵素液でも確認できる。

本発明の硫酸化フカンスルファターゼは塩化ナトリウム及び／又はカルシウムイオンの存在下で活性化される。

塩化ナトリウムは、試薬の塩化ナトリウム、食塩、海水、人工海水等、塩化ナトリウムを含むものならばいかなる物質でも使用できる。本発明の、硫酸化フカンスルファターゼの反応液に添加する塩化ナトリウム濃度は1 mMから2 M程度がよく、好ましくは5 mMから1 M程度がよい。

カルシウムイオンは、試薬の塩化カルシウム、酢酸カルシウム等、カルシウムイオンを含むものならばいかなる物質でも使用できる。本発明の、硫酸化フカンスルファターゼの反応液に添加するカルシウムイオン濃度は0.1 mMから1 M程度がよく、好ましくは1 mMから500 mM程度がよい。

フコイダノバクター マリナス SI-0098株は硫酸化フカンを資化する微生物であり、硫酸化フカンを分解するために菌体内及び菌体外に本発明のエンド型 $\alpha$ —L—フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを生産する。



本発明の硫酸化フカンオリゴ糖とは、ナマコ由来硫酸化フカン、若しくは硫酸化フカン含有物に本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを単独で、または本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼと一緒に作用させて得られるオリゴ糖であり、還元性末端糖がフコースである。硫酸化フカン含有物としては、例えば硫酸化フカンの部分精製品、ナマコ由来硫酸化多糖画分、ナマコの水性溶媒抽出物、干しナマコ、若しくは生ナマコが好適に使用できる。

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を調製する際、硫酸化フカン、若しくは硫酸化フカン含有物の溶解は定法で行えばよく、溶解液中の硫酸化フカン、若しくは硫酸化フカン含有物はその最高溶解濃度でもよいが、通常はその操作性、反応に使用する本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼの量を考慮して選定すればよい。硫酸化フカンの溶解液としては、水、緩衝液等より目的に応じて選択すればよい。反応の条件は、使用する酵素が活性を示す範囲であれば特に限定はないが、溶解液のpHは通常中性付近で、酵素反応は通常30℃付近で行う。反応に使用する本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼの配合比率や使用量、反応液の組成、反応時間等の調整により、硫酸化フカンオリゴ糖の分子量を調整できる。この様にして得られた本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を分子量分画あるいは陰イオン交換カラムにより分画すれば、更に均一な分子量あるいは均一な荷電密度分布の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を調製できる。分子量分画は定法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法を使用すればよい。低分子化物は、必要に応じて更にイオン交換樹脂処理、活性炭処理等の精製操作を行ってもよく、必要に応じて脱塩処理、無菌処理、凍結乾燥処理もできる。

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、硫酸基を分子中に有しており、該基は種々の塩基と塩を形成する。本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、塩になった状態が安定であり、通常ナトリウム及び／又はカリウム及び／又はカルシウム等の塩の形態で提供される。これらの物質の塩はダウエックス50W等の陽イオン交換樹脂を利用して遊離の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖に導ける。また、これらは、必要に応じ公知慣用の塩交換を行い所望の種々の塩に交換できる。

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、薬学的に許容される塩、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム、亜鉛等のアルカリ土類金属、アンモニウム等の塩とすることができる。

5 本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼは硫酸化フカンを低分子化するため硫酸化フカンの構造解析に使用できる。また、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は糖鎖工学用試薬として使用できる。例えば、特公平5-65108号公報記載の方法により2-アミノピリジル化(PA化)を行い、該オリゴ糖のPA-化物を調製すれば、硫酸化フカンオリゴ糖の蛍光標識標準物質として使用できるなど糖鎖工学用試薬として極めて有用な物質を提供できる。

10 また、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は抗原として利用でき、公知の方法により、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を認識する抗体を作製することができる。本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を認識する抗体は、硫酸化多糖の構造解析に利用でき、極めて有用である。

#### 実施例

15 以下に本発明を実施例をもって具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

#### 参考例1 ナマコ由来硫酸化多糖画分の調製

市販のマナマコ35kgの体壁部分を細断し、4倍量のアセトンとともにホモジナイザーで8000回転、5分処理後、ろ紙でろ過し残さを得た。得られた残さを

20 4倍量のアセトンとともにホモジナイザーで8000回転、5分処理後、ろ紙でろ過し残さを得た。得られた残さを吸引乾燥させ、113.2gのナマコ体壁アセトン処理物を得た。

400gのナマコ体壁アセトン処理物を、10リットルの100mM塩化ナトリウム及び10mM塩化カルシウムを含む30mMイミダゾール-塩酸緩衝液

25 (pH6.5)に懸濁し、アクチナーゼEを2g添加し、45℃で3時間処理後、さらに、95℃で2時間処理した。処理液を穴径106 $\mu$ mのステンレス製ふるいでろ過し、得られたろ液に20gの活性炭を添加し、室温で30分間攪拌後、遠心分離した。得られた上清に10%となるようにエタノールを加え、排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過器で2リットルに濃縮後、遠心

分離により不溶物を除去した。得られた上清を限外ろ過器により10%エタノールを含む100mM塩化ナトリウムに溶媒置換した。この溶液を4℃以下に冷却後、塩酸によりpHを2.0とし、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清のpHを水酸化ナトリウムにより8.0とし、限外ろ過器により20mM塩化ナトリウムに溶媒置換した。この溶液中の不溶物を遠心分離により除去後、凍結乾燥し、ナマコ由来硫酸化多糖画分の乾燥物37gを得た。

#### 参考例2 硫酸化フカン画分の調製

参考例1記載のナマコ由来硫酸化多糖画分の乾燥物7gを、50mM塩化ナトリウムと10%エタノールを含む20mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.0)700mlに溶解し、遠心分離により不溶物を除去した。得られた上清を、同緩衝液で平衡化した5リットルのDEAE—セルロファインA—800カラムにかけ、同緩衝液で洗浄後、50mMから2.05Mの塩化ナトリウム濃度勾配により溶出させた。溶出液は500mlずつ分取した。各フラクションの総糖量をフェノール硫酸法により、ウロン酸量をカルバゾール硫酸法により測定した。塩化ナトリウム濃度0.8~1.5Mで溶出された画分(フラクションナンバー45~57)を硫酸化フカン画分とした。

#### 参考例3 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性測定方法

15 $\mu$ lの1%の硫酸化フカン画分溶液と、75 $\mu$ lの50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.5)と、9 $\mu$ lの4M塩化ナトリウムと、41 $\mu$ lの水と、10 $\mu$ lの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ溶液とを混合し、37℃で1時間反応させた後、反応液を100℃で10分間処理し、遠心分離後100 $\mu$ lをHPLCにより分析し、低分子化の程度を測定した。対照として、本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ溶液の代わりに、その酵素溶液を溶解している緩衝液を用いて反応させたもの及び硫酸化フカン画分の代わりに水を用いて反応させたものを同様にHPLCで分析した。

1単位のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性は上記反応系において1分間に1 $\mu$ molの硫酸化フカンのフコシル結合を切断する酵素量とした。エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性は下記式により求めた。

$$\{ (15 \times 1000 \times 1 / 100) / MG \} \times \{ (MG / M) - 1 \} \times \{ 1 / (60 \times 0.01) \} = U / ml$$

15×1000×1/100：反応系中に添加した硫酸化フカン画分（μg）

5 MG：基質硫酸化フカンの平均分子量

M：反応生成物の平均分子量

(MG/M)-1：1分子の硫酸化フカンが酵素により切断された部位の数

60：反応時間（分）

0.01：酵素液量（ml）

10 なお、HPLC条件は下記によった。

装置：L-6200型（日立製作所製）

カラム：OHpak SB-806HQ（8×300mm、昭和電工社製）

溶離液：5mMのアジ化ナトリウムを含む50mMの塩化ナトリウム

検出：視差屈折率検出器（Shodex RI-71、昭和電工社製）

15 流速：1ml/分

カラム温度：25℃

反応生成物の平均分子量の測定のために、市販の分子量既知のプルラン（STANDARD P-82、昭和電工社製）を上記のHPLC分析と同条件で分析し、プルランの分子量と保持時間との関係を曲線に表し、上記反応生成物の分子量測定のための標準曲線とした。また、タンパク質の定量は、酵素液の280nmの吸光度を測定することにより行った。その際1mg/mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算した。

20

#### 参考例4 硫酸化フカンスルファターゼ活性測定方法

15μlの1%の硫酸化フカン画分溶液と、75μlの50mMイミダゾール-塩酸緩衝液（pH7.0）と、6μlの4M塩化ナトリウムと、3μlの1M塩化カルシウムと、31μlの水と、20μlの本発明の硫酸化フカンスルファターゼ溶液とを混合し、37℃で1時間反応させた後、反応液を100℃で10分間処理し、遠心分離後100μlをHPLCにより分析し、生成する硫酸量を測定した。対照として、本発明の硫酸化フカンスルファターゼ溶液の代わりに、

25

その酵素溶液を溶解している緩衝液を用いて反応させたもの及び硫酸化フカン画分の代わりに水を用いて反応させたものを同様にHPLCで分析した。

1 単位の硫酸化フカンスルファターゼ活性は上記反応系において1分間に1  $\mu$ molの硫酸を生成させる酵素量とした。硫酸化フカンスルファターゼ活性は下記式により求めた。

$$S / (60 \times 0.02) = U / ml$$

S: 反応により生成した硫酸 ( $\mu$ mol)

60: 反応時間 (分)

0.02: 酵素液量 (ml)

なお、HPLC条件は下記によった。

装置: L-6200型 (日立製作所製)

カラム: OHpak SB-804HQ (8×300mm、昭和電気社製)

溶離液: 5mMのアジ化ナトリウムを含む50mMの塩化ナトリウム

検出: 示差屈折率検出器 (Shodex RI-71、昭和電気社製)

流速: 1ml/分

カラム温度: 35℃

反応により遊離した硫酸量の測定のために、1mM及び0.5mMの硫酸ナトリウムを上記のHPLC分析と同条件で分析し、硫酸ナトリウム濃度とそのピークの高さとの関係を曲線に表し、遊離硫酸量測定のための標準曲線とした。

#### 実施例1 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの調製 (1)

フコイダノバクター マリナス SI-0098を参考例1の方法で調製したナマコ由来硫酸化多糖画分0.3%とペプトン1%を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー社製) pH8.2からなる培地5mlを120℃、20分間オートクレーブ処理した培地に接種し、25℃で2日培養した。得られた培養物のうち150  $\mu$ lを、上記と同じ成分を含む100mlの培地に植え継ぎ、25℃で3日培養した。上記と同じ成分及び0.01%消泡剤 (KM70、信越化学工業社製) を含む培地600mlを2リットルの三角フラスコに入れたものを7本用意

し、120℃、20分間オートクレーブ処理後、各培地に上記の培養物を1mlずつ接種し、25℃で3日培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。同じ培養を繰り返し、培養液12.6リットルから約15gの湿菌体を得た。

- 5 得られた菌体を200mlの100mM塩化ナトリウム及び5mMβ-メルカプトエタノールを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.5)に懸濁させ、超音波処理により菌体を破碎し、遠心分離して上清を得た。得られた上清を上記の緩衝液で充分透析し、遠心分離して上清を得た。

- 10 得られた上清を同じ緩衝液で平衡化した500mlのDEAE-セルロフィンA-800のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、100mMから500mM塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出液を45mlずつに分画し、各フラクションの本発明のエンド型α-ラーフコシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。

- 15 得られた活性画分を50mM塩化ナトリウム及び5mMβ-メルカプトエタノールを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.5)で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩衝液で平衡化した150mlのDEAE-セルロフィンA-800のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、50mMから400mM塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出液を20mlずつに分画し、各フラクションの本発明のエンド型α-ラーフコシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。
- 20

- 得られた活性画分を50mM塩化ナトリウム及び5mMβ-メルカプトエタノールを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.5)で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩衝液で平衡化した80mlの硫酸化セルロフィンのカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、50mMから1500mM塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出液を5mlずつに分画し、各フラクションの本発明のエンド型α-ラーフコシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。
- 25

得られた活性画分を100mM塩化ナトリウム及び5mMβ-メルカプトエタノールを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.5)で充分透析し溶媒置換した。次に、150mM塩化ナトリウム及び5mMβ-メルカプトエタノ

ールを含む40 mMリン酸カリウム緩衝液で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩衝液で平衡化した40 mlのヒドロキシルアパタイト（和光純薬製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、40 mMから250 mMリン酸カリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出液を6 mlずつに分画し、各フラクションの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。

得られた活性画分を100 mM塩化ナトリウム及び5 mM $\beta$ -メルカプトエタノールを含む10 mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH 7.5）で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩衝液で平衡化した1520 mlのセファクリルS-200（4.4×100 cm、ファルマシア社製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で溶出させ、溶出液を13.5 mlずつに分画し、各フラクションの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を測定した。

こうして本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの精製物を得た。なお、本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼのセファクリルS-200によるゲルろ過の際の溶出位置及び電気泳動の際の泳動距離から求めた該酵素の分子量はそれぞれ、およそ3万2000（2万～4万の分布）及び4万2000（3万～5万の分布）であった。

以上の精製工程を表1にまとめる。

表1

工程	総タンパク質 (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg)	収率 (%)
抽出液	5,520	20,400	3.700	100
DEAE-セルロファイン	193	10,800	56.0	52.9
DEAE-セルロファイン	140	6,700	47.9	32.8
硫酸化セルロファイン	4.58	1,860	406	9.12
ヒドロキシルアパタイト	2.12	2,440	1,150	12.0
セファクリルS-200	1.40	1,220	871	5.98

## 実施例2 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの調製（2）

フコイダノバクター マリナス SI-0098を実施例1に記載の方法で培養し、培養液4.2リットルから約6 gの湿菌体を得た。

得られた菌体を50 mlの50 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナト

リウム緩衝液（pH 7.5）に懸濁させ、超音波処理により菌体を破碎し、遠心分離して上清を得た。得られた上清を上記の緩衝液で充分透析し、遠心分離して上清を得た。

得られた上清を同じ緩衝液で平衡化した300mlのDEAE-セルロファイ  
ンA-800のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、50mMから500mM塩  
化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出液を25mlずつに分画し、各フ  
ラクシヨンの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を  
集めた。

得られた活性画分を100mM 塩化ナトリウムを含む10mM リン酸ナト  
リウム緩衝液（pH 7.5）で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩  
衝液で平衡化した50mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、  
同じ緩衝液で洗浄後、100mMから400mM 塩化ナトリウムの濃度勾  
配により溶出させ、溶出液を10mlずつに分画し、各フラクシヨンの本発明の  
エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。

得られた活性画分を50mM塩化ナトリウムを含む50mMリン酸カリウム緩  
衝液（pH 7.5）で充分透析し溶媒置換した。この酵素溶液を同じ緩衝液で平  
衡化した20mlのヒドロキシルアパタイトのカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄  
後、50mMから200mMのリン酸カリウムの濃度勾配により溶出させ、溶出  
液を10mlずつに分画し、各フラクシヨンの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシ  
ダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。

得られた活性画分を、100mM 塩化ナトリウム及び5mMアジ化ナトリウ  
ムを含む10mM イミダゾール-塩酸緩衝液（pH 7.5）で平衡化した15  
20mlのセファクリルS-200（4.4×100cm、ファルマシア社  
製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で溶出させ、溶出液を13.5mlずつに分画  
し、各フラクシヨンの本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を測定した。

こうして本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの精製物を得た。

以上の精製工程を表2にまとめる。



表 2

工程	総タンパク (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg)	収率 (%)
抽出液	2,067	8,010	3.88	100
透析	1,923	6,980	3.63	87.1
DEAE-セルロファイン	53.3	6,590	124	82.3
DEAE-セルロファイン	29.2	6,500	223	81.1
ヒドロキシルアパタイト	3.91	3,220	824	40.2
セファクリルS-200	1.19	2,280	1,920	28.4

本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの精製物の至適pH、温度、塩濃度を調べた。その結果をそれぞれ図1、図2および図3に示す。

#### 5 実施例3 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを用いた硫酸化フカンオリゴ糖の調製

参考例2に記載の硫酸化フカン画分1.5gを135mlの250mM塩化ナトリウムを含む50mMのイミダゾール塩酸緩衝液(pH8.2)に溶解させ、本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを144mU(15ml)添加し30℃  
10 で4日間攪拌後、1100mlのセルロファインGCL-1000(4×87cm、生化学工業社製)で50mlずつ3回に分けてゲルろ過し分子量分画した。溶出させたフラクションは総て、総糖量をフェノール-硫酸法で測定した。その結果、図7に示すような分布を示した。図7の縦軸はフェノール硫酸法により発色させた際の480nmにおける吸光度、横軸はフラクション番号を示す。すな  
15 わち、フラクション番号50～75の付近を中心に、分子量4万を中心に分布する本発明の硫酸化フカンオリゴ糖が溶出された。これらのオリゴ糖の糖組成、還元性末端糖分析を行ったところ、実質的に総てフコースであった。

すなわち、ナマコ由来硫酸化フカン画分に本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させることにより種々の分子量の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖が調製できた。  
20

#### 実施例4 硫酸化フカンスルファターゼ

実施例1及び2の方法により精製した本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ単独では、ナマコ由来硫酸化フカンを実施例3に示した分子量分布より低分子化させることができなかった。そこで、本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼと

共存してナマコ由来硫酸化フカン画分を低分子化させる画分を探した。その結果実施例 1 に記載した硫酸化セルロファインの溶出画分のうち、600 mM 付近の塩化ナトリウムで溶出される画分に、本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼによる硫酸化フカンの低分子化を活性化させる活性が検出された。そこで、該画分

5 をナマコ由来硫酸化フカンに作用させ、反応液中に生成した物質を調べた。まず、反応液を参考例 4 に記載の方法で HPLC により分析したところ、硫酸の生成が確認できた。次に、糖を含む低分子成分が生成していないかどうかを調べるため、反応液をセルロファイン GCL-25 のカラム (4 × 90 cm) でゲルろ過し、溶出させた各フラクションの総糖量をフェノール-硫酸法により分析した。その

10 結果、糖を含む低分子成分は生成していなかった。このようにして、本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼによる硫酸化フカンの低分子化を活性化させる酵素は硫酸化フカンスルファターゼであることが強く示唆されたので、参考例 4 に記載の方法で活性が検出される硫酸化フカンスルファターゼの精製を行った。

すなわち、実施例 1 に記載した硫酸化セルロファインの溶出画分のうち、600 mM 付近の塩化ナトリウムで溶出される本発明の硫酸化フカンスルファターゼの活性画分を集め、100 mM 塩化ナトリウムと 5 mM アジ化ナトリウムと 5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液で平衡化させた 15.20 ml のセファクリル S-200 のカラムにかけ、同緩衝液で溶出させた。分取は 1 本あたり 13.5 ml で行った。本発明の硫酸化フカンスルファターゼの分子量を溶出位置から計算すると約 8 万 4000 (7 万 ~ 10 万の分布) であった。

本発明の硫酸化フカンスルファターゼの精製物の至適 pH、温度、塩濃度を調べた。その結果をそれぞれ図 4、図 5 および図 6 に示す。

#### 実施例 5 ナトリウム塩濃度の影響

25 本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び本発明の硫酸化フカンスルファターゼの反応系に含まれる塩化ナトリウムの濃度と相対活性の関係を調べた。その結果、本発明のエンド型  $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び本発明の硫酸化フカンスルファターゼは塩化ナトリウムにより賦活化されることが判明した。

#### 実施例 6 カルシウム塩濃度の影響

本発明の硫酸化フカンスルファターゼ反応系に含まれる塩化カルシウムの濃度と相対活性の関係を調べた。その結果、本発明の硫酸化フカンスルファターゼは塩化カルシウムにより賦活化されることが判明した。なお、酢酸カルシウムによっても同様の賦活化がみられた。

5 実施例7 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを用いた硫酸化フカンオリゴ糖の調製

参考例2に記載のナマコ由来硫酸化フカン画分の1%水溶液30 $\mu$ lに、150 $\mu$ lの50mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.0)、14 $\mu$ lの4M塩化ナトリウム、6 $\mu$ lの1M塩化カルシウム、64 $\mu$ lの水を混合し、本発明の  
10 エンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを424 $\mu$ U(16 $\mu$ l)及び本発明の硫酸化フカンスルファターゼを226 $\mu$ U(20 $\mu$ l)添加し30℃で2日間反応後、反応液100 $\mu$ lを参考例4に記載の方法でHPLCにより分析した。その結果を図8に示す。図8の縦軸は差示屈折率の相対強度、横軸は保持時間を示す。生成した本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、7分～10分の位置に分子量9千を中心  
15 値として分布しており、明らかに実施例3に記載のオリゴ糖よりも低分子のオリゴ糖を得ることができた。これらのオリゴ糖の糖組成、還元性末端糖分析を行ったところ、実質的に総てフコースであった。

すなわち、ナマコ由来硫酸化フカン画分に本発明のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び本発明の硫酸化フカンスルファターゼを作用させることにより種々の分子  
20 量の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖が調製できることがわかった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によりナマコ由来硫酸化フカンの構造解析やナマコ由来硫酸化フカンの低分子化物の再現性よい製造に用いることができる新規のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼが提供される。また、該酵素の製造方法についても提供される。また、該酵素を使用することにより糖鎖工学用試薬として有用な様々な分子量の、ナマコ由来硫酸化フカンオリゴ糖が提供される。また、該酵素を効率良く使用するための添加物が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質を有することを特徴とするエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ:

5 (I) 作用: ナマコ由来硫酸化フカンに作用して、 $\alpha$ -L-フコシル結合を加水分解し、硫酸化フカンを低分子化させる;

(I I) 至適pH: 本酵素の至適pHは7~9付近である; および

(I I I) 至適温度: 本酵素の至適温度は約25~45℃である。

10 2. 請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ生産能を有するフコイダノバクター属細菌を培養する工程、およびその培養物から該酵素を採取する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼの製造方法。

3. 下記の理化学的性質を有することを特徴とする硫酸化フカンスルファターゼ:

15 (I) 作用: ナマコ由来硫酸化フカンに作用して、硫酸エステル結合を加水分解し、硫酸を遊離させ、そして請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼと共存して、ナマコ由来硫酸化フカンの低分子化を、請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを単独で作用させた場合よりも進行させる;

(I I) 至適pH: 本酵素の至適pHは6~8付近である; および

20 (I I I) 至適温度: 本酵素の至適温度は約20~45℃である。

4. 請求項3記載の硫酸化フカンスルファターゼ生産能を有するフコイダノバクター属細菌を培養する工程、およびその培養物から該酵素を採取する工程を包含することを特徴とする請求項3記載の硫酸化フカンスルファターゼの製造方法。

25 5. 硫酸化フカンに請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させる工程、および反応物から硫酸化フカンオリゴ糖を取得する工程を包含することを特徴とする硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

6. 塩化ナトリウムの共存下でエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼを作用させることを特徴とする請求項5記載の硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

7. 請求項5記載の方法で得られる硫酸化フカンオリゴ糖。

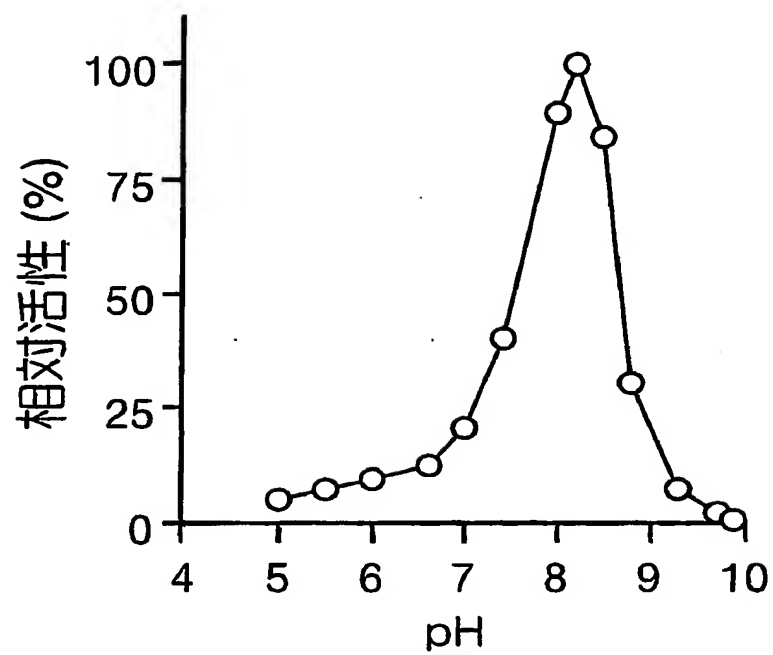
8. 硫酸化フカンに請求項1記載のエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び請求項3記載の硫酸化フカンスルファターゼを作用させる工程、および反応物から硫酸化フカンオリゴ糖を取得する工程を包含することを特徴とする硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

5 9. 塩化ナトリウム及び／又はカルシウムイオンの共存下でエンド型 $\alpha$ -L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンスルファターゼを作用させることを特徴とする請求項8記載の硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

10. 請求項8記載の方法で得られる硫酸化フカンオリゴ糖。

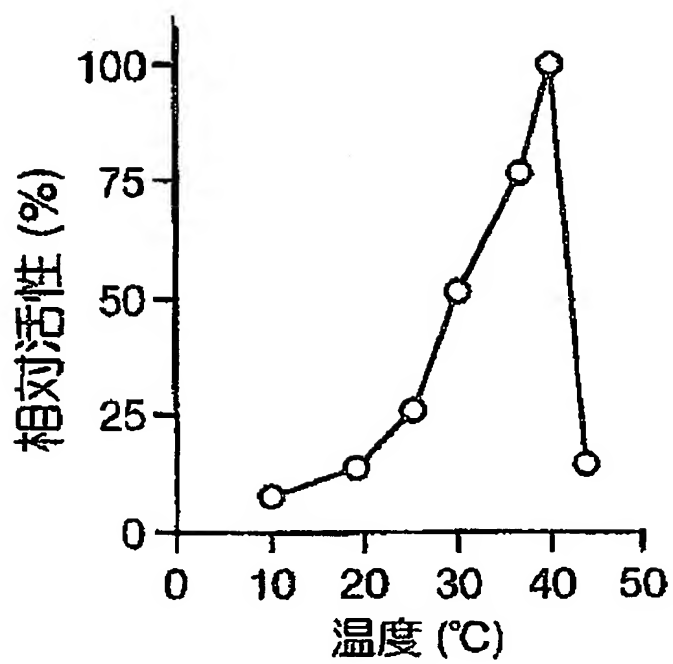
1 / 8

図 1



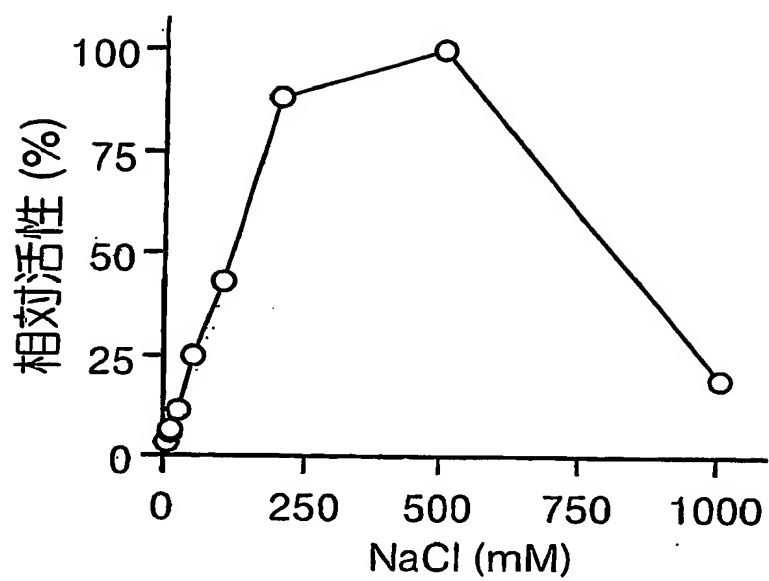
2 / 8

図 2



3 / 8

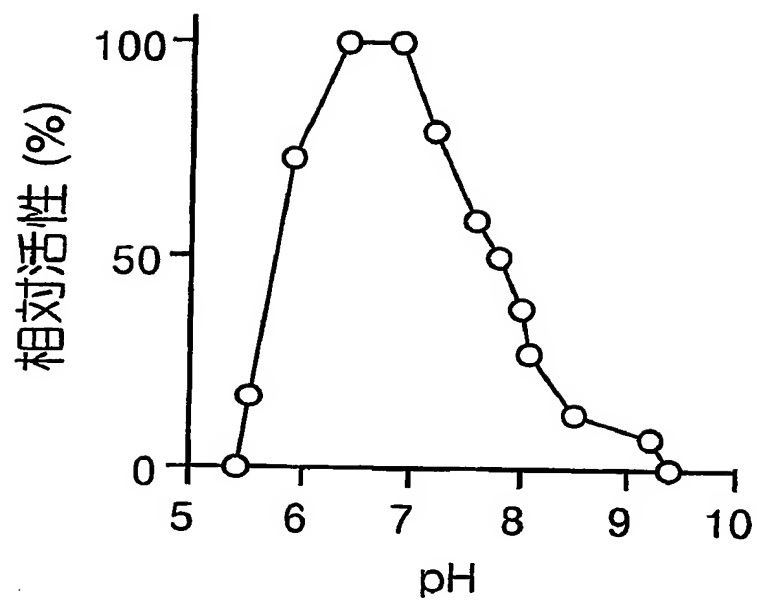
図 3





4 / 8

図 4



5 / 8

図 5

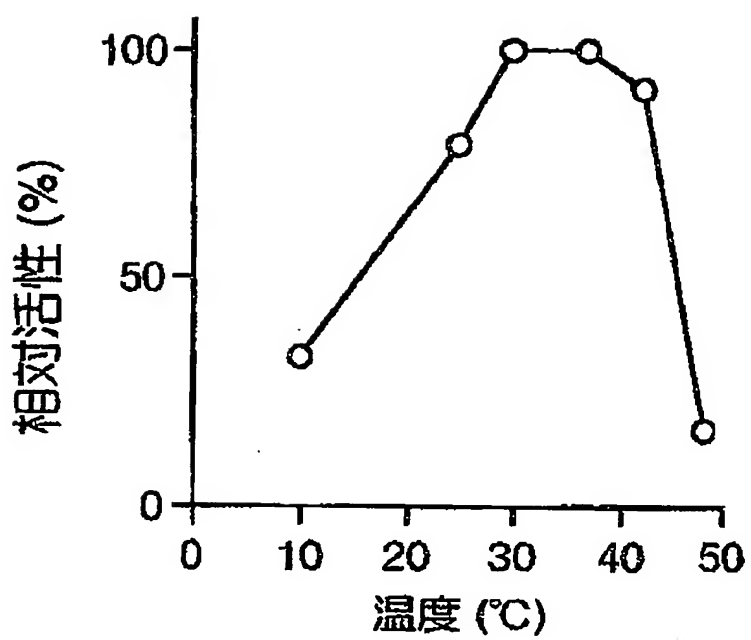
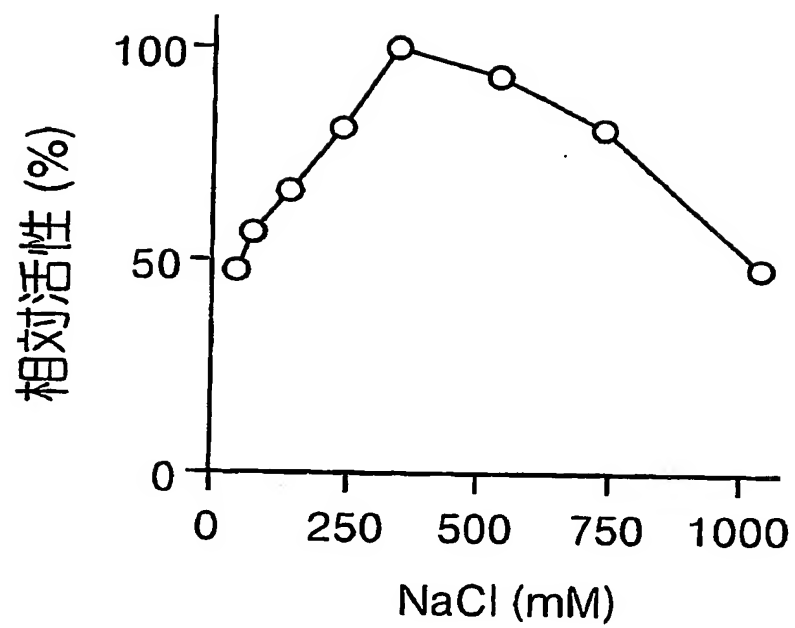


図 6



7 / 8

図 7

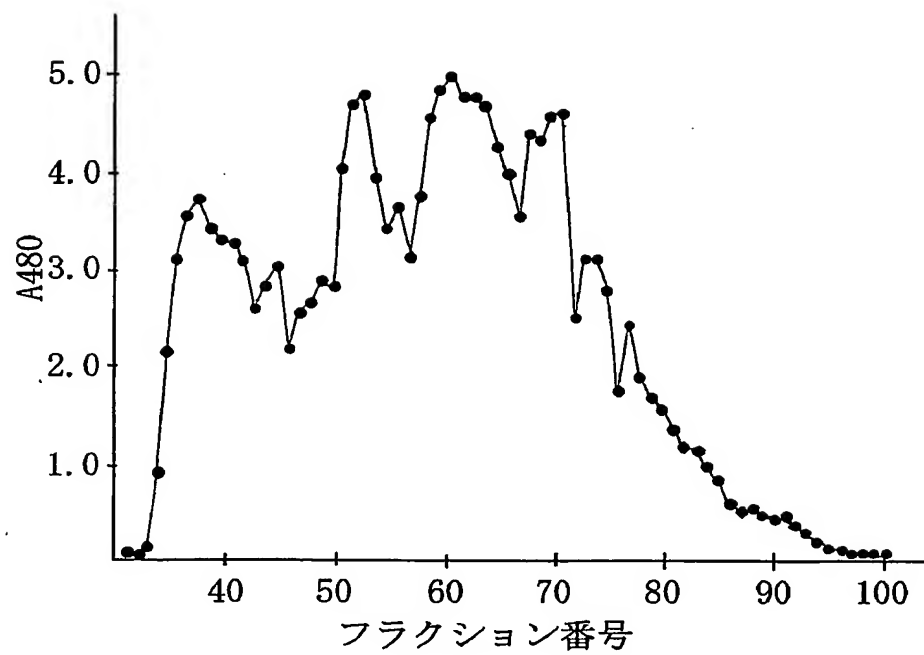
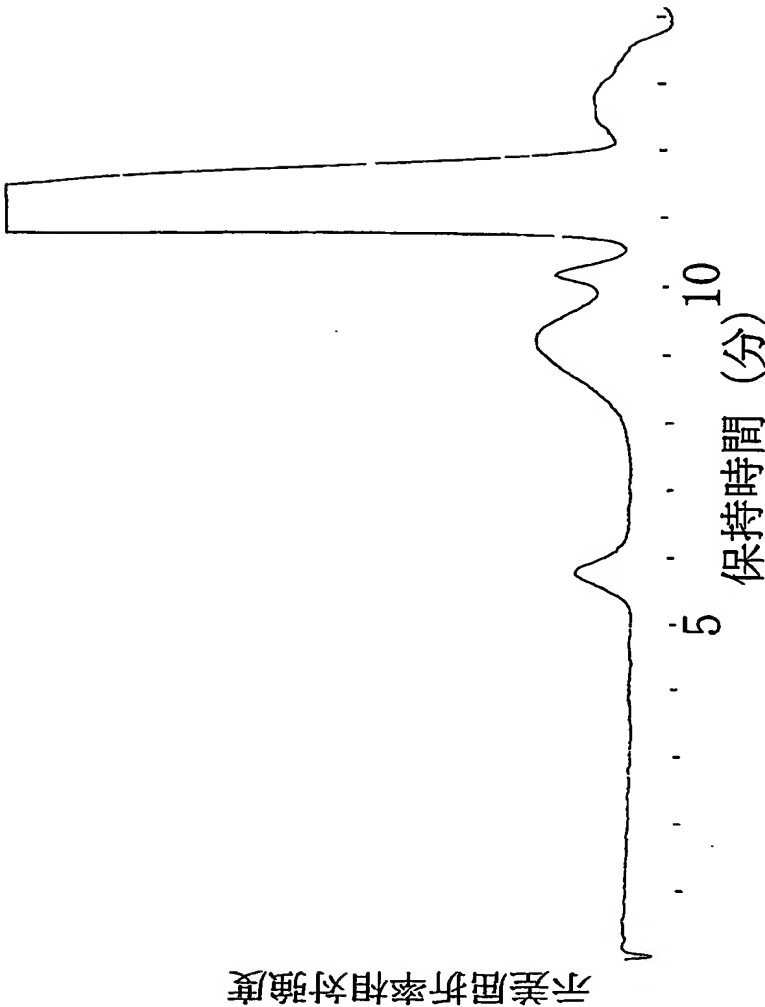


図 8



## SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Enzyme for digesting sulfated fucan from seacucumber

<130> 663848

<150> JP 2002-180490

<151> 2002-06-20

<150> JP 2002-239843

<151> 2002-08-20

<160> 1

<210> 1

<211> 1521

<212> DNA

<213> *Fucoidanobacter marinus* SI-0098

<400> 1

```
agagtttgat cctggctcag aatgaacgct ggcgggcgtgg ttcagacatg caagtcgaac   60
gggattgtct agttagcttg ctaattagac atgagagtgg cgaacgggtg cgtaacacgt   120
aaagaaccta cccttatgtg ggggatatgct caccgaangg tgaattaata ccgcatgtgg   180
tctctcttca catgaagagt acactnaagc tggggacctt cgggcctggc gcatagggag   240
ggctttgcgg cctatcagct tgttggtgag gtaacggctc accaaggcaa agacnggtag   300
ctggtctgag aagatgatca gccacactgg aacttagaca cggtcagac acctaagggt   360
ggcagcagtt tcgaatcttt cacaatgggc gaaagcctga tggagcaacg ccgcgtgggg   420
```

gatgaaggcc ttcggttgt aaacccctgt caccaaggat aaaacgtaat ctattaatac 480  
taggttgcct gatgtaactt ggagaggaag gagggtgctaa ctctgtgcca gcagccgagg 540  
taatacagag actccaagcg ttattcggat tcaactgggag taaaggagag gcagggggcc 600  
agatgtgtca gaggtgaaat accgcagctt aactgtagaa ctgcctttga aactatctgg 660  
ctagagtatc ggagaggtaa gcggaattcc aggtgtagca gtgaaatgag tagatatctg 720  
gaggaacacc aatggcgaag gcagcttact ggacgattac tgacgctcag gctcgaaagc 780  
atggggagcg aaagggatta gatacccctg tagtccatgc cgtaaagctt gttcactagg 840  
tatcgggaca ttcgaccgtc tcggtgtca agctaacgag ataagtgaac cgcctgagga 900  
ctacggccgc aaggctaaaa ctcaaaggaa ttgacgggag cctgcacaag cgggtgagca 960  
tgtggcttaa ttcatgcaa cgcgaagaac cttacctagg cttgacatgc agtggaccgg 1020  
ggcagagatg ccctttctct tcggagccgc tgcacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct 1080  
cgtgtcgtga gatgtttggt taagtccagc aacgagcgca acccctgcca ctagtggcca 1140  
gcattaagtt ggggactcta gtgggacaaa ctctctctga gagggggaag gtggggacga 1200  
cgtcaagtca gtatggccct tacgtctagg gctgcacacg tgctacaatg cccggtacag 1260  
agggacgcga taccgcgagg tggagcaaat ccttaaagcc gggcccagtt cagattggag 1320  
tctgcaactc gactccatga agttggaatc gctagtaatg gcgcatcagc tatggcgccg 1380  
tgaatacgtt cccaggcctt gtacacaccg cccgtcacgt tatggaagcc ggttttgccc 1440  
gaagtatgtt agctaaccgc caaggaggag gatgtcctaa ggtgaggctg gtaactggaa 1500  
cgaagtcgta acaaggtagc c 1521

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/07838

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/44, C12N9/16, C12N19/04, C08B37/00//C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/44, C12N9/16, C12N19/04, C08B37/00, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Pereira M.S. et al., Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae, J.Biol.Chem., 1999, Vol.274, No.12, pages 7656-67	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9
<u>X</u> A	WO 01/081560 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 01 November, 2001 (01.11.01), Full text & EP 1277834 A1	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9
<u>X</u> A	WO 96/34004 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 31 October, 1996 (31.10.96), Full text & EP 870771 A1 & US 6277616 B1 & US 6379947 B2	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 August, 2003 (29.08.03)	Date of mailing of the international search report 09 September, 2003 (09.09.03)
---	---

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/07838

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Takeshi SAKAI et al., "Namako Yurai Ryusan-ka $\alpha$ -L-fucan o Bunkai suru Kaiyo Saikin Yurai endo- $\alpha$ -L-fucosidase oyobi sulfatase", Dai 23 kai The Japanese Society of Carbohydrate Research Nenkai Yoshishu, 2002 July, page 136, PII-55	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/44, C12N9/16, C12P19/04, C08B37/00 // C12N15/12

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/44, C12N9/16, C12P19/04, C08B37/00, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JSTPlus (JOIS) BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Pereira M. S. et al., Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae, J. Biol. Chem., 1999, Vol. 274, No. 12, pages 7656-67	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9
<u>X</u> A	WO 01/081560 A1 (タカラバイオ株式会社) 2001. 11. 01, 全文 & EP 1277834 A1	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 08. 03

国際調査報告の発送日

09.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4N 3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献 .		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 96/34004 A1 (タカラ酒造株式会社) 1996. 10. 31, 全文 & EP 870771 A1 & US 6277616 B1 & US 6379947 B2	<u>7, 10</u> 1-6, 8-9
P X	酒井武 他, ナマコ由来硫酸化 $\alpha$ -L-fucanを分解する海洋細菌由来 endo- $\alpha$ -L-fucosidase及びsulfatase, 第23回日本糖質学会年会 要旨集, 2002 Jul., page 136, PII-55	1-10